

The effect of Marjrom medicinal herb extract on the expression of some genes involve in resistance to *Septoria tritici* leaf blotch in two wheat Chamran and Yavarous cultivars

Akram Abasi Manesh¹, Arash Fazeli^{1*} and Siamk Beigi²

¹ Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ilam university, Ilam, Iran

² Agricultural Jihad organization of Ilam Province, Ilam, Iran

Abstract

Leaf *Septoria tritici* anamorph *Mycosphaerella graminicola* is one of the main destructive foliar disease of wheat. Resistance cultivars and chemical pesticide are commonly methods that used to control of this disease. In this research, the effect of Marjoram extract was investigated in order to induction of resistance in two resistance and sensitive cultivars of wheat. Experiment was conducted in control (without extract) and treatment (extract) conditions on two cultivars: Chamran as resistance Yavarous as sensitive cultivar at greenhouse condition. Two days after treatment of seedling with extract, inoculation of plants had been done with Dehloran isolate of *septoria tritici* with 7×10^5 spore/ml. RNA extraction and cDNA synthesis from leaf samples were prepared at 6, 12 and 24 hours after contamination for further analysis. The results showed that the expression of *PRI* gene at investigated times between two cultivars at two conditions was different so that after 6h, the *PRI* gene expression in resistance cultivar was peaked about 2.5 fold change rather than sensitive cultivar, while the expression of *Ppi* gene 6h after inoculation, in Yavarous showed 2.5 fold change rather than Chamran cultivar. Application of Marjrom extract increased the expression of *PRI* gene in resistance cultivar, while *Ppi* gene expression increased in sensitive cultivar three fold changes. It is suggested that the use of methanolic extracts of Marjoram medicinal plant can induce resistance and activation of the plant defense system against *M. graminicola* fungal pathogen.

Keywords: *septoria tritici* disease, extract medical plant, wheat resistance, Real Time-PCR

* Corresponding Author: a.fazeli@ilam.ac.ir

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

تأثیر عصاره گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) در بیان برخی ژن‌های دخیل در مقاومت به عامل بیماری سپتوریوز برگی در دو رقم گندم چمران و یاواروس

اکرم عباسی منش^۱، آرش فاضلی^{۱*}، سیامک بیگی^۲

^۱ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

^۲ سازمان جهاد کشاورزی استان ایلام، ایلام، ایران

چکیده

بیماری سپتوریوز برگی گندم که عامل آن قارچ *Mycosphaerella graminicola* است، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم است. ارقام مقاوم و سموم شیمیایی دو روش رایج برای کنترل این بیماری هستند. در پژوهش حاضر، تأثیر عصاره گیاه دارویی مرزنجوش در القای مقاومت در دو رقم حساس و مقاوم گندم بررسی شد. آزمایش در شرایط بدون عصاره (کنترل) و با تیمار عصاره بر دو رقم گندم چمران (مقاوم) و یاواروس (حساس) در گلخانه انجام شد. دو روز پس از تیمار عصاره، آلودگی دو رقم با ایزوله قارچ سپتوریوز دهلران جلیزی به مقدار $10^5 \times 7$ اسپور در میلی‌لیتر آلوده شدند. تهیه RNA و سنتز cDNA از نمونه‌های برگی در سه زمان ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی برای آنالیزهای بعدی انجام شدند. نتایج نشان دادند میزان بیان ژن *pr1* در زمان‌های مختلف بین دو رقم مقاوم و حساس پس از عصاره‌پاشی و آلودگی با ایزوله قارچ، بسیار متفاوت است؛ به طوری که این میزان پس از ۶ ساعت به ۲/۵ برابر رقم حساس رسید؛ اما میزان بیان ژن *ppi* پس از ۶ ساعت تیمار، در رقم یاواروس تقریباً ۲/۵ برابر رقم چمران مشاهده شد. به کار بردن عصاره مرزنجوش بیان ژن *pr1* را در رقم مقاوم و بیان ژن *ppi* را در رقم حساس افزایش داد. با توجه به اینکه بیان ژن *ppi* ۲۴ ساعت پس از آلودگی، در رقم حساس سه برابر رقم مقاوم شد، پیشنهاد می‌شود به کار بردن عصاره متانولی گیاه دارویی مرزنجوش ممکن است القا مقاومت و فعال شدن سیستم دفاعی گیاه را در مقابل بیماری‌زای قارچی *M. graminicola* سبب شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری سپتوریوز، عصاره گیاه دارویی، مقاومت گندم، Real Time PCR

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: a.fazeli@ilam.ac.ir، شماره تماس: ۰۸۴۳۲۲۳۴۸۷۵

مقدمه

بیشترین پایداری را دارد (Adhikari *et al.*, 2004)؛ در حالی که *Stb4* که ۱۵ سال پیش در کالیفرنیا مقاومت خیلی خوبی در گندم‌ها باعث شده بود، به‌تازگی مقاومت آن شکسته شده است (Jackson *et al.*, 2000). بررسی‌های انجام‌شده برای شناسایی ژن‌های مؤثر در ایجاد مقاومت به سپتوریوز برگی با روش cDNA-AFLP نشان داده‌اند علاوه بر این نوع مقاومت اختصاصی یا تک‌ژنی، در مدت پاسخ مقاومت گیاه به این بیماری تظاهر تعداد زیادی از ژن‌ها افزایش می‌یابد (Adhikari *et al.*, 2007). تفاوت در الگوی بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم و حساس پس از آلودگی با قارچ *M. graminicola* ممکن است نقش اصلی را در سازوکارهای مقاومت در گندم داشته باشد. برای نمونه Sedaghatfar و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی با روش cDNA-AFLP چندین قطعه مرتبط با مقاومت به بیماری لکه برگی سپتوریایی (STB) دو رقم فلات (Seri 82) و فرونتانه (Frontana) را جدا کردند که قطعات چندشکلی (polymorphism) در مسیرهای مختلف بیوشیمیایی نقش داشتند. نتایج حاصل از Real-Time PCR نشان دادند برخی ژن‌ها در زمان‌های ارزیابی‌شده، بیان مختلفی در ارقام حساس و مقاوم نشان می‌دهند. در سال‌های گذشته به دلیل بروز برخی مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف سموم شیمیایی در کشاورزی، گرایش زیادی به استفاده از توانایی بالقوه مواد زیستی در کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز ایجاد شده است. گیاهان دارویی به دلیل داشتن طیف وسیعی از ترکیبات زیستی فعال منبع بالقوه داروهای گیاهی جدید (یا شیمی درمانی) هستند؛

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) غذای اصلی بشر در بسیاری از نقاط جهان است که در سال ۲۰۱۳ بیش از ۷۱۴ میلیون تن در جهان تولید شده است (Kiss *et al.*, 2014). با توجه به افزایش روزافزون جمعیت، برای پاسخ‌گویی به نیاز کشورهای در حال توسعه تا سال ۲۰۵۰ به ۶۰ درصد افزایش در واحد تولید گندم نیاز است (Singh and Trethowan., 2007; Singh *et al.*, 2007). از سویی تنش‌های زنده و غیرزنده عامل اصلی محدودکننده تولید گندم هستند که بین آنها بیماری‌های قارچی تهدیدی جدی برای شکاف بین عملکرد واقعی و دست‌یافتنی در گندم هستند (Goutam *et al.*, 2013) قارچ *Mycosphaerella graminicola*، ایجادکننده بیماری سپتوریوز برگی گندم است یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برگی گندم گسترش‌یافته در بسیاری از مناطق دنیا است که در اروپا در درجه اول اهمیت قرار دارد (Thomas *et al.*, 2003). میزان کاهش محصول در آلودگی‌های شدید با این قارچ، ۳۱ تا ۵۳ درصد گزارش شده است (Eyal, 1981; Eyal and Ziv, 1974). استفاده از ارقام مقاوم و سموم قارچ‌کش روش‌های موجود برای کنترل این بیماری در گندم هستند (Adhikari *et al.*, 2007). استفاده از ارقام مقاوم از لحاظ اقتصادی و زیست‌محیطی روش مطمئن‌تری است (Eyal., 1981). مقاومت ژنتیکی در ارقام مختلف به دو صورت کمی و کیفی انجام می‌شود. تاکنون ۱۸ ژن اصلی مقاومت به بیماری (Septoria Tritici Blotch (STB)) نقشه‌یابی شده‌اند که بین آنها *Stb1* در آمریکای مرکزی

عصاره این گیاه دارویی، مقاومت گیاهان حساس را به قارچ *M. graminicola* افزایش می‌دهد و نیز بررسی تأثیر عصاره گیاه دارویی مرزنجوش در القای بیان برخی ژن‌های مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی گندم در دو رقم حساس (یاواروس) و مقاوم (چمران) انجام شد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری نمونه‌های گیاهی: در پژوهش حاضر، عصاره گیاه دارویی مرزنجوش با روش خیساندن بامتانول ۷۰ درصد و با دستگاه هم‌زن برقی (مدل Si 100 R، شرکت Honyang، کره جنوبی) و پمپ خلاء (مدل FTVO-501، شرکت Sci Finetech، کره جنوبی) استخراج شد. در پایان برای جداسازی حلال آلی از عصاره‌ها، از دستگاه روتاری (مدل RV05 BASIC، شرکت IKA-WERKE، ژاپن) استفاده شد. تأثیر هفت عصاره گیاه دارویی مختلف در بازدارندگی رشد با قارچ سپتوریوز در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج نشان دادند عصاره مرزنجوش تأثیر بهتری در کنترل رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی داشت؛ بنابراین آزمایش اصلی بررسی تأثیر عصاره مرزنجوش در القای مقاومت برخی ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی گندم در دو رقم حساس و مقاوم در مرحله گیاهچه‌ای بود.

آلودگی نمونه‌ها و اعمال تیمار: دو رقم گندم چمران و یاواروس که به ترتیب مقاوم و حساس به بیماری سپتوریوز برگی گندم هستند در گلخانه در دو شرایط کنترل و تیمار کشت شدند و وقتی که به مرحله دوبرگی رسیدند، نیمی از گیاهان با عصاره

زیرا داروهای گیاهی به علت داشتن منشأ طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی، سازگاری بیشتری با موجودات زنده دارند و عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کنند. Behdad و همکاران (۲۰۱۳) خاصیت ضدقارچی چند گیاه دارویی از جمله آویشن شیرازی را علیه قارچ *Rhizopus stolonifera* عامل پوسیدگی نرم روی میوه توت‌فرنگی، بررسی کردند. براساس نتایج آنها کاربرد اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام اثر مهارکننده در رشد میسلوم قارچ *R. stolonifera* داشت. Salehzadeh و همکاران (۲۰۱۸) اثر عصاره آویشن را در کنترل و بازدارندگی پمپ ژن NorA در ۱۰ نمونه بیمارستانی بررسی کردند و نشان دادند ژن NorA در همه نمونه‌ها وجود دارد و عصاره آویشن اثر بازدارندگی در بیان ژن در همه نمونه‌های دارای ژن یاد شده نشان داد. بررسی Karisto و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد علاوه بر رشد پیکنیدها در ارقام مختلف که در پژوهش‌های قبلی برای تعیین حساسیت یا مقاومت ارقام استفاده می‌شد باید به طور هم‌زمان به رشد و تکثیر قارچ در میزبان هم توجه شود. Perello و Slusarenko (۲۰۱۳) برای توسعه کشاورزی ارگانیک سازگار نشان دادند استفاده از آب سیر تا اندازه‌ای در کنترل پاتوژن‌های قارچی مؤثر است. با توجه به بررسی تأثیر هفت عصاره گیاه دارویی مختلف در کنترل قارچ سپتوریوز برگی در شرایط آزمایشگاهی نتایج نشان دادند عصاره مرزنجوش بهترین گزینه برای کنترل رشد قارچ در محیط پتری‌دیش است (داده‌ها نشان داده نشده‌اند)؛ بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اینکه آیا

مخلوطی شامل ۱ میکرولیتر Oligo dT (آغازگر)، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۳ میکرولیتر RNA و ۵ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز (Nuclease free Water) افزوده شد (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود). تیوب‌های ۰/۲ (شرکت سینا کلون، ایران) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه بن‌ماری یا حمام آب گرم (مدل S 100، Honyang، کره جنوبی) و سپس به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها به آرامی تکان داده شدند؛ سپس به رشته اول ساخته شده cDNA، ۲ میکرولیتر بافر 10 x Buffer M-Mul V، ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس M-Mul V Reverse Transcriptase و ۷ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز افزوده شد (جدول ۱)؛ سپس ۱۰ میکرولیتر از ترکیب یادشده به تیوب‌ها اضافه شد و تیوب‌ها در بن‌ماری به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند؛ سپس به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. پس از آن به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ (مدل 3-30 K، شرکت Sigma، آلمان) و به فریزر ۸۰- (مدل ALS، شرکت Angelantoni، ایتالیا) منتقل شدند.

جدول ۱- مواد استفاده شده برای سنتز رشته اول cDNA

ماده	مقدار
۱۰ x Buffer M-Mul V	۲ میکرو لیتر
M-Mul V Reverse Transcriptase	۱۰۰ واحد یا ۱ میکرو لیتر
Nuclease- free Water	۷ میکرو لیتر
حجم نهایی واکنش	۱۰ میکرو لیتر

گیاه دارویی مرزنجوش با اسپری دستی عصاره پاشی (تلقیح) شدند. دو روز پس از تیمار نمونه‌ها با عصاره، دو رقم با ایزوله قارچ سپتوریوز دهلران جلیزی آلوده شدند که کارشناسان سازمان جهاد کشاورزی ایلام جمع‌آوری کرده بودند. غلظت اسپورها با لام هموسایتومتر (Neubar، شرکت Marienfeld، آلمان) در زیر میکروسکوپ (مدل H 730، شرکت Nedic، آلمان) تعیین شد. غلظت نهایی برای اسپورپاش $10^5 \times 7$ اسپور در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Kema et al., 1996). پس از اینکه سوسپانسیون قارچ به غلظت مد نظر رسانده شد، به هر لیتر از سوسپانسیون، ۱۰ قطره توین ۲۰ اضافه شد که به چسبندگی اسپورها و باقی ماندن آنها روی برگ هنگام اسپورپاشی منجر می‌شود. اسپورپاشی با اسپری دستی انجام شد. پس از اسپورپاشی، گیاهان در اتاقک رشد در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰ درصد در تاریکی قرار داده شدند. نمونه‌برداری در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی در دو شرایط کنترل و تیمار و هر کدام در سه تکرار انجام شد. نمونه‌های برگ‌ها جمع‌آوری شده بلافاصله به ازت مایع برای استخراج RNA و سایر آنالیزهای بعدی منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از نمونه‌های برگ‌ها با کیت استخراج Cinnapure RNA (PR891620، شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. تعیین کمیت RNA استخراج شده، با روش اسپکتروفتومتری انجام و برای تعیین کیفیت نمونه‌ها از روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. سنتز رشته اول cDNA با کیت (-2-steps RT-PCR، شرکت سینا کلون، ایران) طبق مراحل زیر انجام شد. ابتدا برای سنتز رشته اول cDNA،

PCR با کیت (qPCR GreenMaster with lowRox، شرکت تکاپو زیست، ایران) انجام شد. برای انجام واکنش RT-PCR از ۱۰۰ نانوگرم cDNA سنتز شده، آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های بررسی شده و ژن اکتین برای کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۲).

کیفیت نمونه‌ها با الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد (وزنی - حجمی) ارزیابی شد. **اندازه‌گیری بیان ژن:** از واکنش Real-time PCR (RT-PCR) نیمه کمی برای آنالیز الگوی بیان دو ژن مرتبط با دفاع، در دوره یک‌روزه پس از آلودگی استفاده شد. ارزیابی کمی در واکنش RT-

جدول ۲- آغازگرهای طراحی شده برای واکنش Real time PCR

نام آغازگر	توالی	تعداد نوکلئوتید	دمای اتصال	طول قطعه
اکتین	Actin-F: 5TCCTAACCGAGCGAGGCTTCAT 3	۲۲	۵۶	۱۵۱
	Actin R: 5 GGAAAAGCACTTCTGGGCACC3	۲۱		
<i>pr1</i>	PR 1- F: 5 TAATCTTTCCAGGCGCAG 3	۲۵	۵۲	۱۲۰
	PR 1- R: 5 GTTGAGTCGTAGTCGTAG 3	۲۵		
<i>ppi</i>	PPi-F: 5 GAGATCGACCCGGACAACAG 3	۲۶	۶۰	۱۲۶
	PPi -R: 5 CTCCGTCTTCCTCCATTGG 3	۲۶		

پرایمرهای مربوط به ژن‌های *pr1* و *ppi* برگرفته از پژوهش Adhikari و همکاران (۲۰۰۷) هستند.

واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دماهای اتصال آغازگر به رشته الگو، ۵۳ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بودند. در نهایت، آزمون نقطه ذوب در یک چرخه دمایی شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و افزایش ۰/۳ درجه‌ای تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ترسیم نمودار ذوب محصول PCR انجام شد.

برای آنالیز بیان ژن با روش RT-PCR از روش مبتنی بر رنگ فلورسنس SYBR green در دو تکرار دستگاهی و سه تکرار زیستی استفاده شد. در این روش برای انجام واکنش RT-PCR از پلیت ۴۸ چاهکی ویژه دستگاه Real Time PCR (مدل Step One Plus، شرکت ABI، آمریکا) با حجم واکنش نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل مواد بیان شده در جدول ۳ استفاده شد. برنامه دمایی به کاررفته شامل فعال کردن آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و چرخه ۴۰ تایی شامل دمای

جدول ۳- مواد شیمیایی و مقادیر استفاده شده در واکنش Real Time PCR

غلظت نهایی	مقدار استفاده شده	ماده شیمیایی
	۱۰۰ نانوگرم	Cdna
X۱	۱۰ میکرولیتر	qPCR GreenMaster with lowRox
۰/۵ میکرومول	۰/۸ میکرولیتر	Primer F
۰/۵ میکرومول	۰/۸ میکرولیتر	Primer R
	تا ۲۰ میکرولیتر	RNase free H2O

آستانه سیکل ژن هدف بدون تنش و ژن مرجع متناظر آن است. پایه ۲ به دلیل دوبرابر شدن مقدار cDNA در هر چرخه PCR است.

تحلیل آماری: تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با روش LSD و با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ در سطح احتمال ۵ درصد انجام شدند.

نتایج

کمیت RNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد و وجود دو باند 18S و 28S بدون خردشدگی نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده است (شکل ۱).

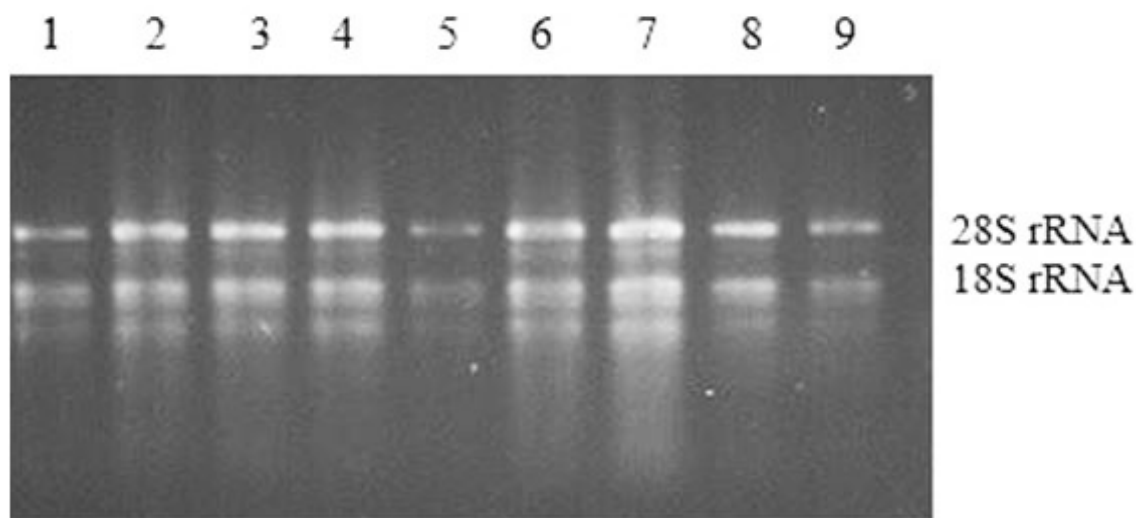
تحلیل داده‌های RT-PCR و بررسی بیان نسبی هر ژن براساس روش نمودار استاندارد نسبی (relative standard curve method) برپایه رابطه ۱ (Livak and Schmittgen, 2001) و با نرم‌افزار محاسباتی شرکت Bio Rad و نیز با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ انجام شد.

رابطه ۱

= مقدار بیان ژن

$$2^{-(C_T \text{ Gene} - C_T \text{ Ref}) \text{ Stress}} / (2^{-(\text{mean } C_T \text{ gene} - \text{mean } C_T \text{ Ref}) \text{ Normal}})$$

مطابق با این رابطه مقدار ژن (cDNA حاصل از رونوشت) برابر با ۲ به توان منفی تفاوت آستانه سیکل (Cycle Threshold = C_T) ژن هدف در تنش و ژن مرجع متناظر آن منهای تفاوت میانگین‌های



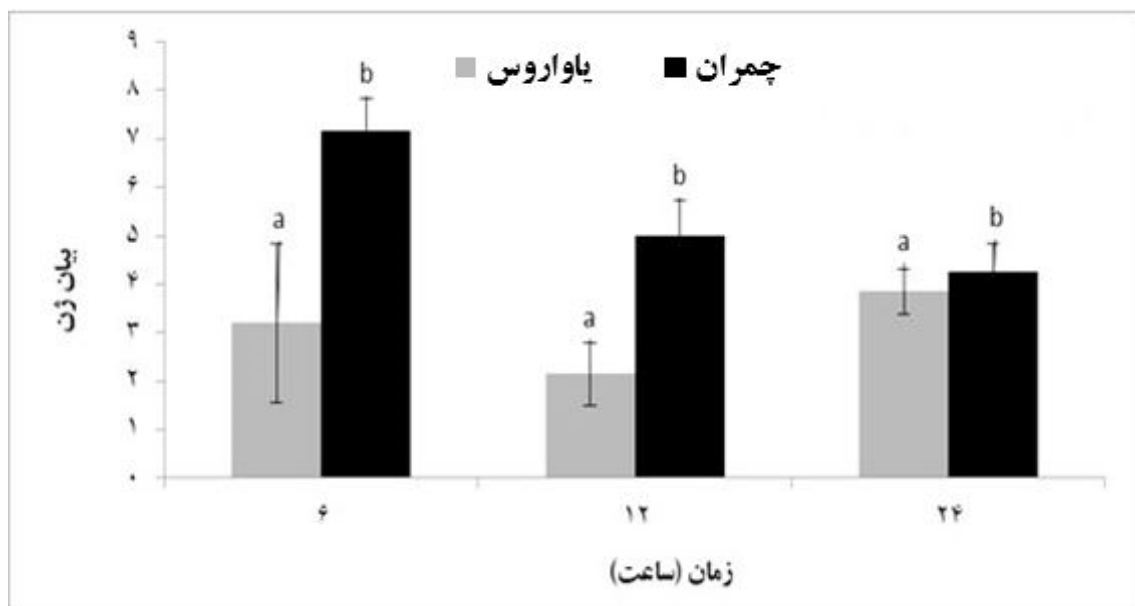
شکل ۱- RNA استخراج شده روی ژل آگارز- دو باند 18S و 28S در برخی نمونه‌های بررسی شده تشکیل شدند.

رقم حساس بود. علاوه بر این، میزان بیان ژن *pr1* ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار در رقم چمران ۲/۵ برابر بیشتر از رقم یاواروس بود. اگرچه میزان بیان ژن *pr1* نسبت به زمان ۶ ساعت پس از اعمال تیمار کاهش یافت، ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، میزان بیان این ژن در رقم حساس به بیشترین مقدار رسید و در رقم مقاوم و حساس تقریباً برابر بود. میزان بیان ژن *pr1* در رقم حساس روند کاهشی - افزایشی و در رقم مقاوم روند افزایش - کاهش را در زمان‌های بررسی شده نشان می‌دهد.

ژن *ppi* نیز C_T های متفاوتی در زمان‌های مختلف و ارقام متفاوت نشان داد که بیان‌کننده میزان بیان متفاوت این ژن در دو رقم حساس و مقاوم در زمان‌های مختلف است. با توجه به شکل ۳ در زمان ۶ ساعت پس از اعمال تیمار، میزان بیان ژن *ppi* در رقم یاواروس تقریباً ۲/۵ برابر رقم

بررسی بیان ژن‌های *pr1* و *ppi* در شرایط طبیعی و تنش: مقدار بیان اندازه‌گیری شده هر ژن با دستگاه در زمان واقعی ثبت و تحلیل می‌شوند. ژن خانه‌دار اکتین در زمان‌های مختلف در دو نمونه بررسی شده مقدار C_T تقریباً یکسانی را نشان دادند که بین می‌کند شرایط محیطی بر بیان ژن‌های خانه‌دار تأثیر نمی‌گذارند؛ در حالی که دستگاه اندازه‌گیری، مقدار C_T را برای ژن‌های کارکردی در زمان‌های مختلف، بسیار متفاوت نشان داد.

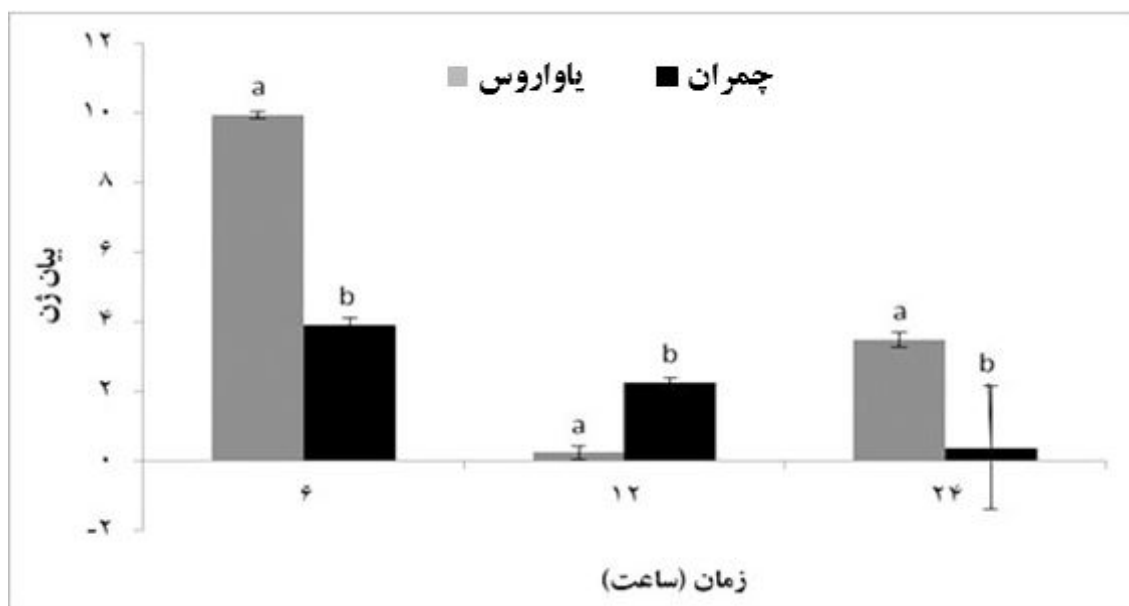
همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود میزان بیان ژن *pr1* در زمان‌های مختلف بین دو رقم مقاوم و حساس پس از عصاره‌پاشی و آلودگی با ایزوله قارچ، بسیار متفاوت است؛ به طوری که ۶ ساعت پس از اعمال تیمار در رقم حساس و مقاوم میزان بیان ژن *pr1* نسبت به سایر زمان‌ها به اوج خود رسید و مقدار بیان ژن *pr1* در رقم مقاوم دو برابر بیشتر از



شکل ۲- بررسی بیان ژن *pr1* در دو رقم یاواروس و چمران در زمان‌های مختلف پس از تلقیح - مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ با آزمون LSD هستند.

رقم چمران میزان بیان این ژن کاهش یافت. به‌طور کلی میزان بیان ژن *ppi* در رقم حساس روند کاهشی - افزایشی ولی در رقم مقاوم روند کاهشی داشت و بجز زمان ۱۲ ساعت، میزان بیان ژن *ppi* در رقم یواروس بیشتر از رقم چمران مشاهده شد.

چمران بود؛ درحالی‌که در زمان ۱۲ ساعت میزان بیان ژن *ppi* در هر دو رقم حساس و مقاوم کاهش یافت؛ ولی میزان بیان آن در رقم چمران ۹ برابر بیشتر از رقم یواروس بود. ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، میزان بیان ژن *ppi* در رقم یواروس دوباره افزایش یافت و ۹ برابر بیشتر از رقم چمران شد و در



شکل ۳- بررسی بیان ژن *ppi* در دو رقم یواروس و چمران در زمان‌های مختلف پس از تلقیح- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ با آزمون LSD هستند.

موجب می‌شوند (Caillet and Lacroix., 2006; Caillet et al., 2005).

Antoniw و همکاران (۱۹۸۰) اصطلاح پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن را مطرح و اعلام کردند پروتئین‌هایی هستند که گیاه آنها رمزگذاری می‌کند؛ اما تنها در شرایط پاتولوژیک یا شرایط مشابه بیان می‌شوند که بیان‌کننده منشاء غیر پاتولوژیک این پروتئین‌ها است. PR1 با پروتئین‌های مشابه توماتین (Thaumatococcus) فعالیت ضدقارچی را در مجموعه‌ای از قارچ‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا نشان می‌دهد (Niderman et al.,

بحث

مصرف عصاره گیاهان دارویی علاوه‌براینکه کاربرد آسان در کنترل بیماری‌های گیاهی دارد، کاهش هزینه‌های کنترل و جلوگیری از از بین رفتن تعادل بوم‌شناختی محیط را باعث می‌شود (Joseph et al., 2008). ترکیبات شیمیایی مرزنجوش شامل اسانس، تانن، رزین، استرول و فلاونوئید هستند (Zargari, 1996). این ترکیبات معمولاً اختلال در غشای سیتوپلاسمی، شکستن و از هم گسیختن نیروی حرکتی پروتون، جریان الکترونی و انتقال فعال و انعقاد و گلوله‌شدن محتویات سلولی را

می‌شود که به‌طور مستقیم از رشد عامل بیماری‌زا جلوگیری و از میزبان در مقابل آنزیم‌های قارچ و مواد سمی محافظت می‌کند. ژن‌های *pr1* در مراحل نخست آلودگی القاء می‌شوند. ژن‌های *pr* به‌شدت در سه ساعت اول پس از آلوده کردن در ارقام مقاوم به *M. graminicola* القاء می‌شوند.

Ray و همکاران (۲۰۰۳) برپایه بررسی الگوی بیان ژن در مدت چهار روز اول پس از آلوده کردن نشان دادند سه پروتئین وابسته به بیماری‌زایی (PR) به نام‌های PR-1، PR-2 و PR-5 در برگ‌های گیاهان آلوده، سه تا دوازده ساعت پس از آلودگی القاء شده‌اند. Adhikari و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند بیان ژن *pr1* ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح به بیشترین مقدار می‌رسد. Fazeli (۲۰۱۲) نشان داد بیان ژن *pr1* در واکنش به قارچ *M. graminicola* در هر دو رقم مقاوم و حساس افزایش یافت و ۱۲ ساعت پس از تلقیح، میزان بیان آن در رقم مقاوم به‌طور مشخص ۵ برابر بیشتر از رقم حساس بود. براساس پژوهش‌هایی که بر ارقام مقاوم گندم انجام شدند Ray و همکاران (۲۰۰۳) این نظریه را مطرح کردند که تغییرات ایجادشده در بیان ژن‌ها در مدت دوازده تا بیست و چهار ساعت نخست آلودگی، پیروزی یا شکست میزبان را تعیین می‌کنند. پس از آن مشخص شد این نظریه درباره همه ژن‌ها صدق نمی‌کند؛ سپس این نظریه مطرح شد که دفاع میزبان دو پیک القای ژنی دارد که پیک اول در دوازده تا بیست و چهار ساعت اولیه آلودگی ایجاد می‌شود و پیک دوم که خیلی قوی‌تر القاء می‌شود، دوازده تا هجده روز پس از آلوده کردن شروع می‌شود. همچنین پژوهش‌ها نشان دادند القای بیان این ژن‌ها

1995). پروتئین‌های مرتبط با عامل بیماری‌زا با مقاومت به بیماری در تقابل گیاه - پاتوژن در غلات ارتباط دارند (Buchel and Linthorst, 1999; Van Loon and Van Strien, 1999). پروتئین‌هایی مانند PR2 (بتا ۱ و ۳ گلوکوناز) و PR3 (کیتیناز) فعالیت‌های ضد قارچی دارند و دیواره سلولی را تجزیه می‌کنند یا مستقیماً از رشد پاتوژن جلوگیری می‌کنند (Takeuchi *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1997; Jia and Martin, 1999) و به‌صورت PAPMs/MAMPs عمل می‌کنند (Nurnberger *et al.*, 2004; Altenbach and Robatzek., 2007). پس از حمله عامل بیماری‌زا گیاهان، تعدادی از سازوکارهای دفاعی شامل اکسیداسیون، تغییرات دیواره سلولی و تولید اجزاء مرتبط با دفاع مانند PRها و کیتینازها (Bolwell, 1999; Kini *et al.*, 2000; Shetty *et al.*, 2008) را انجام می‌دهند. این پروتئین‌ها دیواره سلولی قارچ را تجزیه و از رشد آن جلوگیری می‌کنند (Kim and Hwang., 1997).

Shetty و همکاران (۲۰۰۹) همه پروتئین‌های مرتبط با عامل بیماری‌زا و کیتینازها را در برگ‌های گندم آلوده به *S. tritici* بررسی کردند و نتایج آنها نشان دادند مقاومت با تجمع اولیه بتا ۱ و ۳ گلوکوناز و کیتیناز در برگ‌ها مرتبط است و براساس نتایج آنها گلیکوپروتئین‌هایی مانند اکتینسین به آپوپلاست آزاد می‌شوند و تجمع کالوز به تقویت دیواره سلولی منجر می‌شود. نتیجه کلی پژوهش‌های آنها نشان داد مقاومت با تشخیص سریع و اولیه پاتوژن با بتا ۱ و ۳ گلوکان در دیواره سلولی قارچ ارتباط دارد و به تجمع بتا ۱ و ۳ گلوکوناز و واکنش‌های ساختاری دفاعی منجر

لگاریتمی در ارقام حساس افزایش می‌یابد. Fazeli (۲۰۱۲) نشان داد میزان بیان ژن *ppi* در رقم فلات در زمان‌های انتهایی یعنی ۶ روز پس از آلودگی بود که این میزان بیان در ۶ روز پس از آلودگی افزایش یافت و به بیشترین میزان یعنی ۲ برابر نسبت به شاهد رسید. در رقم مقاوم فروتانا (Frontana) میزان بیان ژن *ppi* نسبت به شاهد افزایش چشمگیری نشان نداشت و تنها ۲۴ ساعت پس از آلودگی، افزایش بیان دو برابری داشت. نتیجه‌گیری می‌شود با به کار بردن عصاره متانولی مرزنجوش، بیان ژن *ppi* در رقم حساس، ۲۴ ساعت پس از آلودگی نسبت به رقم مقاوم بیشتر می‌شود و افزایش مقاومت رقم حساس را باعث می‌شود. نتایج پژوهش Moridikia و همکاران (۲۰۱۶) بر اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی مرزه سفید و نانو ذره روی اکسید در بیان ژن کوآگولاز (*coa*) در نمونه‌های بالینی و استاندارد *Staphylococcus aureus* مقاوم به پنی‌سیلین با روش RT-PCR نشان دادند عصاره هیدروالکلی مرزه سفید بیان ژن *coa* را در شرایط آزمایشگاهی کاهش داد؛ ولی تأثیری در بیان ژن خانه‌دار *arcC* نداشت. Jalalvandi و همکاران (۲۰۱۵) اثر مهاری مرزه خوزستانی را در ژن‌های *agr* آنزیم *s*، *agr* توکسین A و سیستم‌های ترشحی و خارج‌کننده پمپ‌های آنتی‌بیوتیک *pseudomonas aeruginosa* با روش RT-PCR نیمه‌کمی بررسی و مشخص کردند این گیاه اثر مهاری در ژن‌های یادشده دارد که با نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد؛ زیرا گیاهان تیره نعناعیان (Lamiaceae) به دلیل داشتن ترکیبات شیمیایی تیمول و کارواکرول خاصیت

در ارقام حساس در زمان مشابه نسبت به ارقام مقاوم بسیار ناچیزتر است. Adhikari و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند پیک دوم القای بیان ژن در ارقام مقاوم دقیقاً زمانی اتفاق می‌افتد که در ارقام حساس، توده قارچی به سرعت در حال رشد است؛ بنابراین تغییر رشد عامل بیماری‌زا از بیوتروفیک به نکروتروفیک در ارقام مقاوم تشخیص داده شد که پاسخی قوی و موفق را باعث می‌شود. براساس بررسی‌ها نتیجه‌گیری می‌شود پاشیدن عصاره گیاه دارویی مرزنجوش مقاومت را در رقم حساس، ۲۴ ساعت پس از آلودگی افزایش می‌دهد و به القای سیستم دفاعی گیاه در مقابل عامل بیماری‌زا کمک شایان توجهی می‌کند.

FKBPها یا پروتئین‌های پپتیدیل پرولیل ایزومراز (PPI) بازدارنده ایمنی، از قارچ‌ها مشتق می‌شوند که از طریق اتصال به FK506 و اپامایسین عمل می‌کنند (Park et al., 2007). سایکلوپیلین‌های گیاهی با تنش‌های ناشی از عوامل زنده و غیرزنده القاء می‌شوند (Godoy et al., 2000). سایکلوپیلین‌های گیاهی فعالیت ضد قارچی دارند (Lee et al., 2007). Ray و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند بیشتر ژن‌های مرتبط با دفاع در دو رقم مقاوم تادینا (Tadiana) و W7984 پس از آلودگی با سیگنالینگ، متابولیسم انرژی و سنتز پروتئین‌ها همراه هستند. بیان بیشتر ژن *ppi* در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس نشان می‌دهد تولید انرژی و مسیر سیگنالینگ هورمون‌ها در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس بیشتر فعال هستند. Adhikari و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند فعالیت این ژن در ارقام مقاوم، زمانی است که زیتوده قارچ به‌طور

را در پژوهش حاضر موجب می‌شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ایلام برای حمایت مالی از پژوهش حاضر و کارشناسان آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

- Adhikari, T. B., Balaji, B., Breeden, J. and Goodwin, S. B. (2007) Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71(1-3): 55-68.
- Adhikari, T. B., Yang, X., Cavaletto, J. R., Hu, X., Buechley, G., Ohm, H. W., Shaner, G. and Goodwin, S. B. (2004) Molecular mapping of *Stb1*, a potentially durable gene for resistance to *septoria tritici* blotch in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 109(5): 944-953.
- Altenbach, D. and Robatzek, S. (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(9): 1031-1039.
- Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S. and Van Loon, L. C. (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology* 47(1): 79-87.
- Behdad, M., Etemadi, N. A., Behdad, E. and Zeinali, H. (2013) Antifungal effects of three plant essential oils against *Rhizopus stolonifer*, the cause of soft rot on strawberry fruit. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 29(2): 399-411 (in Persian).
- Bolwell, G. P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 2(4): 287-294.

ضدقارچی دارند. در پژوهش Kim و همکاران (۲۰۱۳) مشخص شد کارواکروول بیان ژن‌های *dxra* *sreb1c* و *fas leptin* را کاهش می‌دهد و از سویی افزایش بیان ژن *sirt1* را باعث می‌شود؛ بنابراین کارواکروول بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم چربی‌ها را تعدیل و تنظیم می‌کند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

جمع‌بندی

خسارت اقتصادی ناشی از *M. graminicola* در جهان نیازمند روش‌های مؤثر در کنترل این بیماری است. استفاده از قارچ‌کش‌ها و ارقام مقاوم که مقاومت جزئی به بیماری سپتوریای برگ‌گی دارند، در حال حاضر روشی رایج در کنترل این بیماری است. کاربرد عصاره گیاهان دارویی یکی از منابع خوب برای مدیریت و کنترل بیماری‌ها در آینده است. گیاه مرزنجوش به دلیل داشتن ترکیبات کارواکروول گزینه خوبی برای بررسی‌های بیشتر درباره شیوه کنترل بیماری سپتوریوز است. به کار بردن عصاره مرزنجوش افزایش بیان ژن *pr1* را در رقم مقاوم و افزایش بیان ژن *ppi* را در رقم حساس باعث شد. باتوجه به آثار کلی بیان ژن در دو رقم حساس و مقاوم نتیجه‌گیری می‌شود به کار بردن عصاره گیاه دارویی فعال‌شدن سیستم دفاعی گیاه را در مقابل پاتوژن باعث می‌شود؛ به طوری که بیان ژن *ppi* ۲۴ ساعت پس از آلودگی در رقم حساس خیلی بیشتر از رقم مقاوم می‌شود. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند باتوجه به وجود ترکیب شیمیایی کارواکروول در مرزنجوش به نظر می‌رسد این ترکیب افزایش بیان ژن‌های استفاده‌شده

- Buchel, A. S. and Linthorst, H. J. M. (1999) PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: Pathogenesis-related proteins in plants (Eds. Datta, S. K. and Muthukrishnan, S.) 21-47. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Caillet, S. and Lacroix, M. (2006). Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 69(12): 2961-2969.
- Caillet, S., Shareck, F. and Lacroix, M. (2005) Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Food Protection 68(12): 2571-2579.
- Eyal, Z. (1981) Integrated control of *Septoria* diseases of wheat. Plant Disease 65(9): 763-768.
- Eyal, Z. and Ziv, O. (1974) The relationship between epidemics of *Septoria* leaf blotch and yield losses in spring wheat. Phytopathology 64(11): 1385-1389.
- Fazeli, A. (2012) Transcriptional responses of wheat to *Septoria tritici* disease using microarray technique. PhD Thesis, Mazandaran university, Mazandaran, Iran (in Persian).
- Godoy, V. A., Lazzaro, A. S., Casalongue, C. A. and San-Segundo, B. (2000) Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. Plant Science 152(2): 123-134.
- Goutam, U., Kukreja, S., Tiwari, R., Chaudhary, A., Gupta, R. K., Dholakia, B. B. and Yadav, R. (2013) Biotechnological approaches for grain quality improvement in wheat: present status and future possibilities. Australian Journal of Crop Science 7(4): 469-483.
- Jackson, L. F., Dubcovsky, J., Gallagher, L. W., Wennig, R. L., Heaton, J. and Vogt, H. (2000) Regional barley and common and durum wheat performance tests in California. Agronomy Progress Report 272(1): 48-56.
- Jalalvandi, N., Bahador, A., AZahedi, B., Saghi, H. and Esmaeili, D. (2015) The study of inhibitory effects of *satureja khuzestanica* essence against mexa and mexr efflux genes of *pseudomonas aeruginosa* by RT-PCR. International Journal of Biotechnology 4(1): 1-8.
- Jia, Y. and Martin, G. B. (1999) Rapid transcript accumulation of pathogenesis-related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease-resistant tomato plants. Plant Molecular Biology 40(3): 455-465.
- Joseph, B., Dar, M. A. and Kumar, V. (2008) Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* F. sp. melongenae incitant of brinjal wilt. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 3(2): 56-59.
- Karisto, P., Hund, A., Yu, K., Andregg, J., Walter, A., Mascher, F., McDonald, B. A. and Mikaberidze, A. (2018) Ranking quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch in Elite Wheat Cultivars Using Automated Image Analysis. Phytopathology 108(5): 568-581.
- Kema, G. H. J., Yu, D. Z., Rijkenberg, F. H. J., Shaw, M. W., Baayen and R. P. (1996) Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Phytopathology 86(4): 777-786.
- Kim, E., Choi, Y., Jang, J. and Park, T. (2013) Carvacrol protects against Hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet by enhancing SIRT1-AMPK signaling. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 50(2): 103-115.
- Kim, Y. J. and Hwang, B. K. (1997) Isolation of a basic 34 kilo Dalton b-1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. Physiological and Molecular Plant Pathology 50(2):103-115.
- Kini, K. R., Vasanthi, N. S. and Shetty, H. S. (2000) Induction of b-1,3-glucanase in seedlings of pearl millet in response to infection by *Sclerospora graminicola*. European Journal of Plant Pathology 106(3): 267-274.
- Kiss, T., Balla, K., Veisz, O., Lang, L., Bedo, Z., Griffiths, S., Isaac, P. and Karsai, I. (2014) Allele frequencies in the VRN-A1, VRN-B1 and VRN-D1 vernalization response and PPD-B1 and PPD-D1 photoperiod sensitivity genes and their effects on heading in a diverse

- set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding* 34: 297-310.
- Lee, S. O., Choi, G. J., Jang, K. S., Lim, H. K., Cho, K. Y. and Kim, J. C. (2007) Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathology Journal* 23(2): 97-102.
- Moridikia, F., Khosrovani, S., Ghaedi, M., Zoladl, M., Moridikia, A., Mohseni, R., Alamdari, A. K. and Sharifi, A. (2016) The antimicrobial effect of *Satureja mutica* hydroalcoholic extract, zinc oxide nanoparticle, and zinc complex on the coagulase gene expression in clinical and standard isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Armaghane-Danesh* 21(3): 305-313 (in Persian).
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. and Mösinger, E. (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108(1): 17-27.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198(1): 249-266.
- Park, S. C., Lee, J. R., Shin, S. O., Jung, J. H., Lee, Y. H., Son, H., Park, Y., Lee, S. Y. and Hahm, K. S. (2007) Purification and characterization of an antifungal protein, C-FKBP, from Chinese cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(13): 5277-5281.
- Perello, A., Noll, U. and Slusarenko, A. J. (2013) *In vitro* efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. *Journal of Medicinal Plants Research Full Length* 7(24): 1809-1817.
- Ray, S., Anderson, J. M., Urmeev, F. I. and Goodwin, S. B. (2003). Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Molecular Biology* 53(5): 741-754.
- Salehzadeh, A., Sadat Hashemi Doulabi, M., Sohrabnia, B. and Jalali, A. (2018) The effect of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on the expression of norA efflux pump gene in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Genetic Resources* 4(1): 26-36.
- Sedaghatfar, E., Zamanizadeh, H. R., Roohparvar, R., Farsad, L. K., Fazeli, A., Rezaee, S. and Mardi, M. (2012) Gene expression profiling of defense-related genes resistant to *Septoria tritici* blotch in wheat. *African Journal of Biotechnology* 11(72): 13633-13644.
- Shetty, N. P., Jensen, J. D., Knudsen, A., Finnie, C., Geshi, N., Blennow, A., Collinge, D. B. and Jorgensen, H. J. L. (2009) Effects of beta-1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defense responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60(15): 4287-4300.
- Shetty, N. P., Jørgensen, H. J. L., Jensen, J. D., Collinge, D. B. and Shetty, H. S. (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121(3): 267-280.
- Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Sharma, R., Joshi, A. K. and Trethowan, R. (2007) High yielding spring bread wheat germplasm for global irrigated and rainfed production systems. *Euphytica* 157(3): 351-363.
- Singh, R. P., and Trethowan, R. (2007) Breeding spring bread wheat for irrigated and rainfed production systems of the developing world. In: *Breeding major food staples* (Eds. Kang, M. and Priyadarshan, P. M.) 109-140. Blackwell Publishing, Iowa.
- Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Tanaka, K., Shibata, D. and Horino, O. (1990) Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, b-1,3-endoglucanase, in soybean. *Plant Physiology* 93(2): 673-682.
- Thomas, C., Meyer, D., Wolff, M., Hember, C., Alioua, M. and Steinmetz, A. (2003) Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene.

- Plant Molecular Biology 52(5): 1025-1036.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(2): 85-97.
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Leo, N. J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., Raskin, I. and Shah, D. M. (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology* 115(2): 427-435.
- Zargari, A. (1996) Medicinal plants. 6th edition, Tehran University Press, Tehran (in Persian).